International Journal of Oral Biology, Vol. 39, No. 4 December 31 2014, p. 201-206
Copyright ⓒ 2014, *The Korean Academy of Oral Biology*
http://dx.doi.org/10.11620/IJOB.2014.39.4.201

International Journal of Oral Biology

Antimicrobial Activity of Mulberry Leaf against Mutans Streptococci and Periodontopathogens

Soon-Nang Park[1], Yun Kyong Lim[1], Eugene Cho[1], Eojin Jo[1], Pyoung-Sim Park[2], and Joong-Ki Kook[1,*]

[1]*Korean Collection for Oral Microbiology and Department of Oral Biochemistry, School of Dentistry, Chosun University, Gwangju, Korea*
[2]*Department of Biochemistry and Molecular Biology, School of Medicine, Chosun University, Gwangju, Korea*

(received November 17, 2014; revised December 4, 2014; accepted December 7, 2014)

This study investigated the antimicrobial activity of methanol extract of mulberry leaf against 16 strains of mutans streptococci and four species of periodontopathogens: *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*, *Fusobacterium nucleatum*, and *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*. The antimicrobial activities of the crude extracts or silica gel chromatography fractions of methanol-extracted mulberry leaf were evaluated by determining minimal inhibitory concentrations using an established microdilution method. The cytotoxicity of the extracts of mulberry leaf on KB cells was tested by the methyl thiazolyl tetrazolium assay. Chromatography fraction 12 displayed the most potent antimicrobial activity against all 16 strains of mutans streptococci, *P. gingivalis*, and *P. intermedia*. No KB cell cytotoxicity was evident up to 128 μg/ml of fraction 12. The methanol extract had no antimicrobial activity against *F. nucleatum* and *A. actinomycetemcomitans*. These results suggest chromatography fraction 12 methanol extract of mulberry leaf could be useful in the development of oral hygiene products, such as dentifrice and oral hygiene solution, for the prevention of dental caries.

Key words: antimicrobial effect, mulberry leaf, mutans streptococci, periodontopathogens

*Correspondence to: Joong-Ki Kook, Korean Collection for Oral Microbiology and Department of Oral biochemistry, College of Dentistry, Chosun University, 309 Pilmun-daero, Dong-gu, Gwangju 501-759, Korea.
Tel.: 82-62-230-6877, Fax: 82-62-224-3706,
E-mail: jkkook@chosun.ac.kr

This is an Open-Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

서론

치아우식증과 치주질환은 구강에서 가장 빈번하게 발생하며 두 질환 모두 구강 내 세균이 주요한 원인 인자로 알려져 있다. 치아우식증의 주요한 원인균은 뮤탄스 그룹 연쇄구균이라고 알려져 있으며, 사람 구강에는 *Streptococcus mutans, Streptococcus sobrinus*, 등이 주로 서식하는 것으로 알려져 있다[1-3]. 치주질환의 주요한 원인균은 주로 치은연하치면세균막에 서식하는 *Treponema denticola, Porphyromonas gingivalis*, *Tannerella forsythia, Prevotella intermedia*, *Fusobacterium nucleatum* 및 *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* 등의 그람 음성 혐기성세균들이라고 보고되고 있다[4-6]. 그러므로 치아우식증 및 치주질환원인균을 제거하는 것이 두 질환의 예방 및 치료에 있어서 가장 효과적인 방법이라 생각된다. 치아우식증과 치주질환의 예방 및 치료보조제로 사용할 항균물질로 우선적으로 고려해 볼 수 있는 게 항생제이다. 하지만, 항생제는 세균들에게 내성을 유발시킬 수 있다는 단점이 있어 장기간 사용할 수 없는 단점이 있다. 이러한 단점을 보안하기 위해 매우 오랜 시간 동안 민간이나 전통 한의학에서 음식이나 약재로 사용되어온 천연물을 이용하여 치아우식증 및 치주질환원인균에 대한 항균활

성에 관한 연구가 활발히 진행되고 있다[7-10].

뽕나무는 잎, 열매 및 뿌리가 모두 약용으로 오랫동안 사용되고 있으며, 최근 연구들에 의하면 이들은 혈당저하(잎, 열매), 항산화(열매), 혈압저하(잎), 항세균(잎, 뿌리), 항바이러스(열매), 항염증(뿌리) 및 항암(뿌리) 작용 등이 있는 것으로 보고되고 있다[11-18]. 뽕나무 잎(상엽)의 구강 미생물에 대한 항세균 작용 연구는 *Actinomyces viscosus*와 *S. mutans*를 대상으로 한 것만 있다[13]. 특히 상엽의 정제하지 않은 메탄올 추출물 및 이로부터 추출한 단일화합물(1-deoxynojirimycin)이 치면 생체막(dental biofilm)의 생성을 억제한다고 보고되었다[13]. 하지만, 치주질환원인균에 대한 상엽 메탄올 추출물에 대한 항세균 작용에 관한 연구는 아직까지 없는 실정이다. 최근 천연추출물의 항우식작용을 조사하기 위해 한국인의 구강에서 분리 동정된 뮤탄스 그룹 연쇄구균(14 균주)과 *S. mutans* 및 *S. sobrinus* 표준균주들로 구성된 세균모델 시스템이 개발되어 보고되었다[19]. 그러므로 본 연구는 상엽 메탄올 추출물의 치아우식증 원인균(*S. mutans*와 *S. sobrinus*)과 치주질환원인균(*P. gingivalis*, *P. intermedia*, *F. nucleatum* 및 *A. actinomycetemcomitans*)에 대한 항균능을 최소성장억제농도(minimum inhibitory concentration, MIC)를 측정하여, 향후 치아우식증 및 치주질환의 예방 및 치료 보조를 위한 구강위생용품(치약 및 구강양치용액) 개발에 사용 가능하는지를 알아보기 위하여 실시하였다.

재료 및 방법

상엽 메탄올 추출

본 연구에서 사용한 상엽은 대한민국 영천에서 생산된 것으로 보림한약제약(Jinju, Korea)에서 구입하였다. 건조된 상엽을 분쇄기에 갈아 분말 상태로 만든 후 100 g당 메탄올(DA JUNG, Seoul, Korea) 500 ml을 넣은 후 48시간 동안 실온에서 shaking incubator로 추출 하였다. 추출액은 Whatman filter paper (Whatman 1Ps, Sigma, St Louis, MO, USA)로 여과한 후 5,000 rpm에서 20분 간 원심분리 하여 상층액만을 얻었다. 이 상층액을 회전농축기(RV 10, IKA, Seoul, Korea)로 40℃, 80 rpm으로 농축하고 농축물을 다시 동결건조(LABCONCO, Kansas City, MO, USA) 하여 상엽 메탄올 추출물을 얻었다.

실리카 겔 크로마토그래피

상엽 메탄올 추출물을 분획하기 위해 실리카 겔(Silica gel 60, Merck, Darmstadt, Germany) 300 g을 n-Hexane (DA JUNG) 1 L와 유리 비이커에 넣고 유리막대로 충분히 저어 기포를 제거한 후 유리컬럼(40x600 mm)에 실리카 겔 현탁액을 넣어 채웠다. 컬럼 충진물이 평형화 되도록 n-Hexane 500 ml을 흘려주었다.

메탄올 추출물 2 g을 demethyl sulfoxide (DMSO, Sigma) 10 ml에 녹이고, ethyl acetate (DA JUNG, Seoul, Korea) 90 ml을 DMSO (sigma)에 녹인 추출물에 넣어 잘 섞었다. 침전물을 제거하기 위하여 원심분리(1,500 rpm, 10분) 한 후 상층액을 유리 비이커에 넣고 20 g의 실리카 겔 분말(powder)를 넣어 잘 섞은 후 후드장치에 넣고 실온에서 48시간 동안 용매를 기화시켜 분말 상태로 건조시켰다. 추출물-실리카 겔 분말에 n-Hexane 100 ml을 넣어 잘 섞은 후 컬럼 충진물 위에 조심히 넣었다. 이동상 용액은 n-Hexane:ethyl acetate 비율이 10:0, 9:1, 8:2, 7:3, 5:5, 0:10이 되도록 만든 후 순서대로 컬럼에 흘려주었다. 각 비율의 용액을 500 ml씩 3번 분획하여 회전농축기(IKA)로 40℃, 80 rpm으로 농축한 다음 동결건조기(LABCONCO)를 이용하여 건조시켰다. 이렇게 해서 다음과 같은 18개의 실리카 겔 크로마토그리피 분획을 얻었다: 10:0-Ⅰ(F1), 10:0-Ⅱ(F2), 10:0-Ⅲ(F3), 9:1-Ⅰ(F4), 9:1-Ⅱ(F5), 9:1-Ⅲ(F6), 8:2-Ⅰ(F7), 8:2-Ⅱ(F8), 8:2-Ⅲ(F9), 7:3-Ⅰ(F10), 7:3-Ⅱ(F11), 7:3-Ⅲ(F12), 5:5-Ⅰ(F13), 5:5-Ⅱ(F14), 5:5-Ⅲ(F15), 0:10-Ⅰ(F16), 0:10-Ⅱ(F17), 0:10-Ⅲ(F18). 동결 건조된 각각의 실리카 겔 크로마토그래피 분획물들(F1~F18)과 정제하지 않은 상엽 메탄올 추출물을 동결 건조한 것은 DMSO (Sigma)로 10 mg/ml 농도로 녹인 후 13,000 rpm에서 10분 동안 원심분리(5415D, Eppendorf, Hamburg, Germany)하여 상층액을 취하여 다음 실험에 사용하였다.

세균 및 세균배양

항균실험에서 사용된 표준 균주들인 *A. actinomycetemcomitans* ATCC 33384^T, *F. nucleatum* ATCC 25586^T, *P. gingivalis* ATCC 33277^T, *P. intermedia* ATCC 25611^T, *S. mutans* ATCC 25175^T 및 *S. sobrinus* ATCC 33478^{T}등은 American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA, USA)에서 구입하여 사용하였다. 한국인의 구강에서 분리 동정된 *S. mutans* (KCOM 1054, KCOM 1111, KCOM 1113, KCOM 1116, KCOM 1126, KCOM 1128, KCOM 1136, KCOM 1197, KCOM 1202, KCOM 1207, KCOM 1217) 및 *S. sobrinus* (KCOM 1157, KCOM 1196, KCOM 1221) 균주들은 한국구강미생물자원은행(Korean Collection for Oral Microbiolgy, KCOM, Gwangju, Korea)에서 분양 받아 사용하였다.

*A. actinomycetemcomitans*는 0.6% yeast extract, 5% horse serum, 75 mg/ml of bacitracin, and 5 mg/ml of vancomycin

(Sigma)이 첨가된 tryptic soy broth (TSB, Becton, Dickinson and Company, Sparks, MD, USA) 배지에서 배양하였다. *P. gingivalis*, *P. intermedia* 및 *F. nucleatum* 균주들은 TSB에 0.5% yeast extract, 0.05% cysteine HCl-H_2O, 0.5 mg/ml hemin 및 2 μg/ml vitamin K_1이 첨가된 배지에 배양 하였다. 이들 혐기성 세균들은 85% N_2, 10% CO_2, 5% H_2가 공급되는 37℃ 혐기성 세균배양기(Bactron I, Sheldon Manufacturing Inc., Cornelius, OR, USA)에서 배양하였다. 뮤탄스 연쇄상구균들은 brain heart infusion (BHI, Becton, Dickinson and Company) 한천배지에 도말 하여, 37℃ 세균배양기에서 1-2일간 배양하였다.

최소성장억제농도 측정

실리카 겔 크로마토그래피에서 얻은 분획물의 뮤탄스 연쇄구균 및 치주질환 원인 균주에 대한 항균활성을 알아보기 위해 앞선 연구에서 기술된 방법대로 최소성장억제농도 값을 측정하여 분석하였다[9]. 각각의 액체배지를 이용하여 37℃ 혐기성 세균배양기에서 세균을 24시간 배양한 후, 파장 595 nm에서 배양액의 흡광도를 측정하여 흡광도 값이 0.05가 되도록 배지로 희석하고, 1×10^6 CFU/㎖가 되도록 100배를 더 희석하였다. 각각의 분획물을 25.6 mg/ml이 되도록 DMSO (Sigma)로 희석하여 96 well plate에 4 μl를 넣고 각각의 배지 196 μl를 넣어 순차적으로 희석하고, 희석된 균주를 100 ㎕씩 넣어 최종 농도 1, 2, 4, 8, 16, 32, 64, 128, 256 μg/ml에서 항균활성을 측정하였다. 실험의 음성대조군은 DMSO를 세균 배양액의 1%가 되도록 첨가하였고, 양성대조군은 ampicillin (100 mg/ml)를 세균배양액의 1%가 되도록 첨가하였다. 각 농도의 시료와 세균 혼합액을 혐기성 배양기에서 48시간 배양하고, 595 nm에서 흡광도를 측정하

Table 1. Summary of antimicrobial activities of methanol-extract of mulberry leaf against oral pathogens

Species and strains	Minimum inhibitory concentration (μg/ml)																		
	CR	F1	F2	F3	F4	F5	F6	F7	F8	F9	F10	F11	F12	F13	F14	F15	F16	F17	F18
F. nucleatum ATCC 25586^T	>128	>128	>128	>128	>128	>128	>128	>128	>128	>128	>128	>128	>128	>128	>128	>128	>128	>128	>64
A. actinomycetemcomitans ATCC 33384^T	>128	>128	>128	>128	>128	>128	>128	>128	>128	>128	>128	>128	>128	>128	>128	>128	>128	>128	>64
P. gingivalis ATCC 33277^T	>128	>128	>128	>128	>128	>128	>128	>128	>128	>128	64	32	8	16	4	8	16	>64	>64
P. intermedium ATCC 25611^T	>128	>128	>128	>128	>128	>128	>128	>128	>128	>128	>64	64	32	32	16	32	>64	>64	>64
S. mmutans ATCC 25175^T	>128	>128	>128	>128	>128	>128	>128	>128	>128	>128	>128	>128	128	>128	>128	>128	>128	>128	>128
S. mutans KCOM 1054	>128	>128	>128	>128	>128	>128	>128	>128	>128	>128	>128	>128	64	>128	64	>128	>128	>128	>128
S. mutans KCOM 1111	>128	>128	>128	>128	>128	>128	>128	>128	>128	>128	>128	>128	64	>128	>128	>128	>128	>128	>128
S. mutans KCOM 1113	>128	>128	>128	>128	>128	>128	>128	>128	>128	>128	>128	>128	128	>128	64	64	>128	>128	>128
S. mutans KCOM 1116	>128	>128	>128	>128	>128	>128	>128	>128	>128	>128	>128	>128	64	>128	64	>128	>128	>128	>128
S. mutans KCOM 1126	>128	>128	>128	>128	>128	>128	>128	>128	>128	>128	>128	>128	128	>128	>128	>128	>128	>128	>128
S. mutans KCOM 1128	>128	>128	>128	>128	>128	>128	>128	>128	>128	>128	>128	>128	128	>128	64	>128	>128	>128	>128
S. mutans KCOM 1136	>128	>128	>128	>128	>128	>128	>128	>128	>128	>128	>128	>128	64	128	>128	64	>128	>128	>128
S. mutans KCOM 1197	>128	>128	>128	>128	>128	>128	>128	>128	>128	>128	>128	>128	128	>128	>128	>128	>128	>128	>128
S. mutans KCOM 1202	>128	>128	>128	>128	>128	>128	>128	>128	>128	>128	>128	>128	64	>128	>128	>128	>128	>128	>128
S. mutans KCOM 1207	>128	>128	>128	>128	>128	>128	>128	>128	>128	>128	>128	>128	64	>128	>128	>128	>128	>128	>128
S. mutans KCOM 1217	>128	>128	>128	>128	>128	>128	>128	>128	>128	>128	>128	>128	64	>128	64	32	>128	>128	>128
S. sobrinus ATCC 33478^T	>128	>128	>128	>128	>128	>128	>128	>128	>128	>128	>128	>128	64	>128	16	32	>128	>128	>128
S. sobrinus KCOM 1157	>128	>128	>128	>128	>128	>128	>128	>128	>128	>128	>128	>128	128	>128	>128	64	>128	>128	>128
S. sobrinus KCOM 1196	>128	>128	>128	>128	>128	>128	>128	>128	>128	>128	>128	>128	128	>128	32	32	>128	>128	>128
S. sobrinus KCOM 1221	>128	>128	>128	>128	>128	>128	>128	>128	>128	>128	>128	>128	64	>128	32	32	>128	>128	>128

CR, crude extract of methanol-extract mulberry leaf; F, silica gel chromatography fraction of methanol-extract mulberry leaf; ATCC, American Type Culture Collection; KCOM, Korean Collection for Oral Microbiology.

여 양성 대조군과 같은 흡광도 값을 갖는 농도를 최소성장억제농도 값을 측정하였다. 각 반응은 3회 반복 실험하였다.

KB 세포주 배양

KB 세포주는 ATCC에서 구입하였으며, Modified Eagles Medium (Life Technologies, Grand Island, NY, USA)에 10% Fetal Bovine Serum (Gibco BRL)과 1% Antibiotic-Antimycotic (Gibco BRL)이 혼합된 세포배양액을 이용하여 37℃에서 5% CO_2가 첨가되고, 100% 습도가 유지되는 세포 배양기에서 배양하였다[9].

상엽 메탄올 추출물의 세포 생존율 평가

최소성장억제농도 측정에 사용된 실리카겔 크로마토그래피 분획물(F12, F13, F14 및 F15)의 농도 값을 참고하여, 각각의 분획물 8, 16, 32, 64, 128, 256 μg/ml의 농도에서 KB 세포에 대한 세포 생존율을 MTT (3-[4,5-Dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide, a tetrazole) 분석법을 이용하였으며, 앞선 연구에서 기술된 방법대로 측정하였다[9]. 실험의 음성대조군은 DMSO를 세균 배양액의 1%가 되도록 첨가하였고, 모든 반응은 3회 반복 실험하였다.

결과

치주질환 원인 균주에 대한 정제하지 않은 상엽 메탄올 추출물액과 실리카 겔 크로마토그래피하여 얻은 분획물의 항균활성을 알아보기 위해 최소성장억제농도 값을 측정한 결과는 Table 1과 같았다. 분획물 중 n-hexane:ethly acetate 비율이 7:3-Ⅱ(F11), 7:3-Ⅲ(F12), 5:5-Ⅰ(F13), 5:5-Ⅱ(F14) 및 5:5-Ⅲ(F15)인 분획물이 본 연구에서 사용한 농도 범위 내에서 *P. intermedia* ATCC 25611^T 및 *P. gingivalis* ATCC 33277^{T}에 대해 항균 활성이 있었다(Table 1). 이들 중 F14 분획물에서 가장 좋은 활성을 보였다. 하지만, 본 연구에서 사용한 정제하지 않은 상엽 메탄올 추출물과 실리카 겔 크로마토그래피하여 얻은 분획물의 농도 범위 내에서는 치주질환원인균 중 *A. actinomycetemcomitans* ATCC 33384^{T}과 *F. nucleatum* ATCC 25586^{T}에서는 항균 활성을 보이지

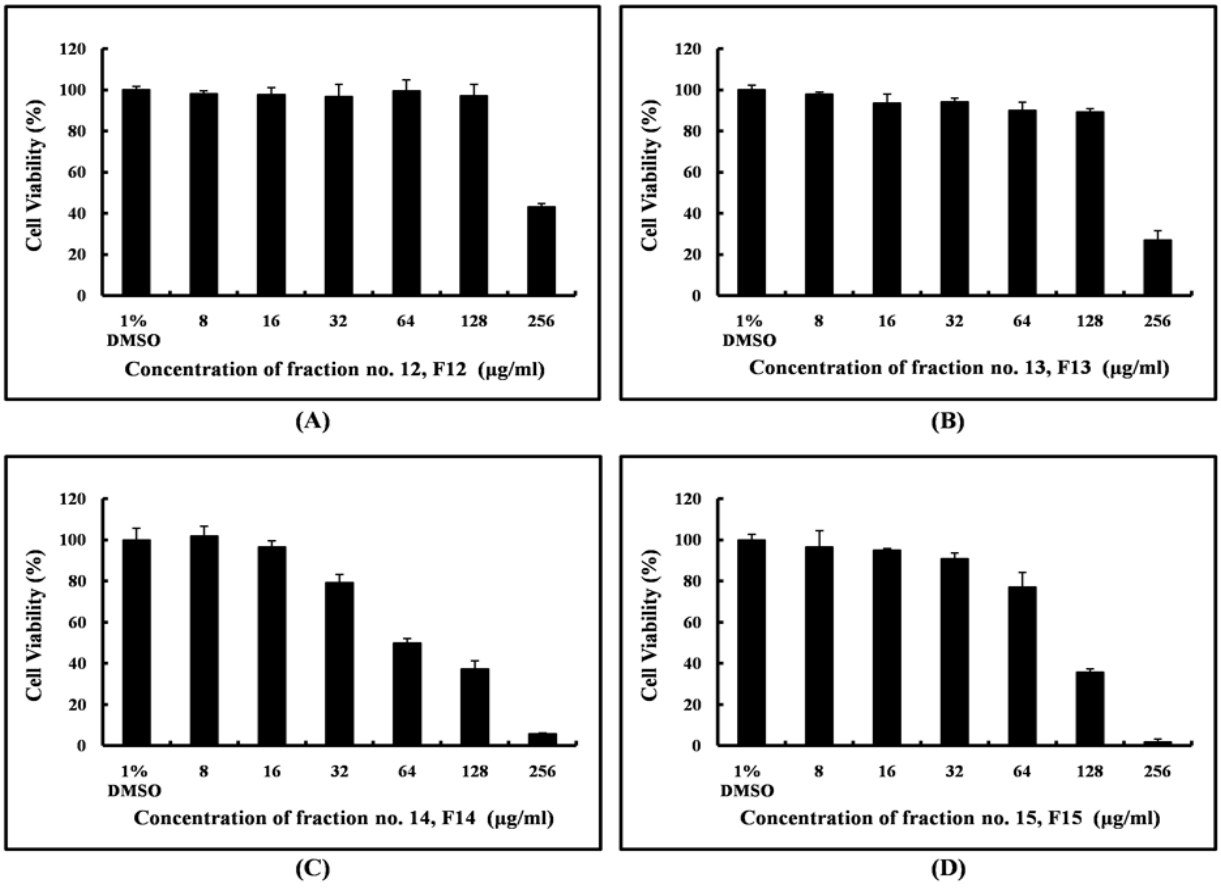

Fig. 1. Effects of silica gel chromatography fractions, F12 (A), F13 (B), F14 (C), and F15(D), of methanol-extracted mulberry leaf on the cell viability of KB cells.

않았다.

항우식 천연물질의 항균작용을 평가하기 위해 개발된 세균모델 시스템에 속하는 16주 뮤탄스 그룹 연쇄구균들에 대한 상엽 메탄올 추출물의 실리카 겔 크로마토그래피 분획 중 F12 분획물이 모든 균주에 대해 64-128 μg/ml 범위에서 최소성장억제농도 값을 갖는 것으로 조사되었다(Table 1). 또한 F13, F14 및 F15 분획물들도 1균주 이상의 뮤탄스 그룹 연쇄구균에 대해 본 연구에서 사용한 농도 범위 내에서 항균 활성을 가졌다(Table 1).

본 연구에서 사용된 *P. intermedia* ATCC 25611^T, *P. gingivalis* ATCC 33277^T 또는 뮤탄스 그룹 연쇄구균에 대한 항균 활성을 갖는 상엽 메탄올 추출물의 실리카 겔 크로마토그래피 분획들(F12, F13, F14 및 F15)의 KB 세포주를 이용하여 세포 독성 실험을 MTT 분석법으로 조사 하였다(Fig. 1). 그 결과 F12 및 F13 분획물들은 128 μg/ml 농도까지, F14 분획물은 16 μg/ml 농도까지, 그리고, F15 분획물은 32 μg/ml 범위 내에서 95% 이상의 세포 생존율을 보여, 세포 독성이 없는 것으로 조사되었다.

고찰

본 연구 결과에 의하면, 상엽 메탄올 추출물의 실리카 겔 크로마토그래피 F12 (n-hexane:ethly acetate 비율이 7:3-Ⅱ) 분획물이 본 연구에서 사용된 뮤탄스 그룹 연쇄구균, *P. intermedia* ATCC 25611^T 및 *P. gingivalis* ATCC 33277^{T}에 대하여 4-128 μg/ml 범위에서 최소성장억제농도 값을 갖는 것으로 조사되었다(Table 1). 또한, 상엽 메탄올 추출물의 실리카 겔 크로마토그래피 분획들 중 뮤탄스 그룹 연쇄구균 및 *P. intermedia* ATCC 25611^T 및 *P. gingivalis* ATCC 33277^{T}에 대한 항균능이 가장 뛰어난 F12 분획물은 128 μg/ml 농도까지 KB 세포주에 대한 세포 독성이 거의 없었다(Fig. 1).

최근 95% 에탄올을 이용한 상엽추출물의 *S. mutans* MTCC 497 균주에 대한 최소성장억제농도 값이 125 μg/ml 이었다는 보고가 있었다[13]. 하지만, 본 연구에서 사용된 메탄올 상엽 추출물은 표준균주를 포함한 16개 *S. mutans* 균주들에 대해서는 128 μg/ml 내에서는 항균력이 없는 것으로 조사되었다(Table 1). 이러한 결과의 차이는 현재로써는 확실하지 않지만, 두 연구에서 사용된 상엽의 원산지와 사용된 균주가 상이하고 용매가 서로 다르기 때문인 것으로 생각된다. 앞에서 소개한 Islam 등[13]의 연구에서 상엽 에탄올 추출물이 항균능을 보이고 있다는 점을 고려해서 본 연구에서는 실리카 겔 크로마토그래피를 이용한 분획물들을 얻어 항균능을 조사하게 되었다. 그 결과 F12 분획물이 본 연구에서 사용된 뮤탄스 그룹 연쇄구균들에 대하여 64-128 μg/ml 범위에서 최소성장억제농도 값을 갖는다는 것을 알 수 있었다(Table 1). 또한 F13, F14 및 F15 분획물들도 항균능의 차이는 있지만, 본 연구에서 사용된 뮤탄스 그룹 연쇄구균 1 균주 이상에서 128 μg/ml 이하의 농도에서 최소성장억제 농도 값을 보였다(Table 1). 최근 상엽 에탄올 추출물에서 분리된 단일 화합물인 1-deocynojirmycin이 *S. mutans* MTCC 497 균주에 대해 15.6 μg/ml의 최소성장억제농도 값을 갖는다고 보고되었다[13]. 이러한 연구 결과들을 고려하면, 향후 연구를 통하여 본 연구에서 뮤탄스 그룹 연쇄구균에 대한 항균능이 있는 것으로 조사된 실리카 겔 크로마토그래피 F12-F15 분획물들로부터 항균능을 보이는 단일 화합물들을 분리 정제하는 연구가 필요할 것으로 생각된다.

정제하거나 분획화하지 않은 천연추출물들은 균주에 따라 항균 활성능이 매우 다양함을 알 수 있었다[19]. 예를 들어, 황백 메탄올 추출물의 경우 55 균주의 뮤탄스 그룹 연쇄구균들(40 균주의 *S. mutans* 및 15 균주의 *S. sobrinus*)에 대한 최소살균농도 값이 0.063-2.0 mg/ml 범위를 가졌다[19]. 또한 황련 및 오배자 메탄올 추출물들의 경우는 각각 0.125-1.0 mg/ml 및 0.125-2.0 mg/ml 범위의 최소살균농도 값을 갖었다[19]. 이러한 결과를 바탕으로 항우식능을 갖는 천연물 추출물들의 항균능을 비교하고 구강위생용품 개발 시 적정 농도를 결정하기 위한 세균모델시스템을 개발되었다[19]. 비록 본 연구에서는 상엽 메탄올 추출물의 뮤탄스 그룹 연쇄구균에 대한 최소살균농도 값을 얻지 못해 다른 천연추출물들과의 항우식능을 비교할 수는 없었지만, 향 후 연구들에서 항우식능 비교 평가를 위한 세균모델시스템을 사용하면 천연추출물들간의 항균능을 서로 비교해 볼 수 있고, 치약이나 구강양치용액 개발 시 항우식능을 보이는 적정 농도를 정하는 데 널리 사용할 수 있을 것이라 생각된다.

상엽 메탄올 추출물의 실리카 겔 크로마토그래피 F11-F15 분획물들은 *P. intermedia* ATCC 25611^T 및 *P. gingivalis* ATCC 33277^{T}에 대하여 항균능을 보였다. 하지만, *F. nucleatum* ATCC 25586^T 및 *A. actinomycetemcomitans* ATCC 33384^{T}에 대해서는 본 연구에서 사용한 최고 농도인 128 μg/ml에서는 항균능이 없었다(Table 1). 이러한 혐기성 그람 음성 세균에 대한 상엽 메탄올 추출물에 대한 연구 결과가 없고, 이들의 항균기전에 관한 연구는 없기 때문에 치주질환원인균종에 따른 항균능 차이에 대한 이유는 현재로써는 알 수 없다. 하지만, 최근 oleanolic acid (OA)와 ursolic acid (UA)에 대한 뮤탄스 그룹 연쇄구균 및 치주질환원인균종에 대한 항균능 결과는 본 연구 결과와 매우 유사한 경향을 보인다[9,10,20]. 즉, OA와 UA는 모두 사포닌 유도체로 뮤탄스 그룹 연쇄구균과 *P. intermedia* ATCC 25611^T 및 *P.*

gingivalis ATCC 33277^{T}에 대해서는 항균능을 보이는 반면, *F. nucleatum* ATCC 25586^T 및 *A. actinomycetemcomitans* ATCC 33384^{T}에 대해서는 항균능을 갖지 않았다. 두 연구 결과에 의하면, 상엽 메탄올 추출물 크로마토그래피 분획물 F12에는 OA와 UA와 같은 사포닌 유도체를 포함하고 있을 가능성이 있을 것이라 생각된다. 하지만, 향 후 연구에 의해 단일 화합물을 추출하여 그 구조를 밝혀야 할 것이며, 이들의 항균기전을 밝히는 연구도 필요하다고 생각된다.

이상의 연구결과들을 종합할 때, 상엽 메탄올 추출물 크로마토그래피 분획물 F12는 128 μg/ml 농도로 치아우식증 예방 및 치료보조제로 사용할 치약 및 구강양치용액 등의 개발에 이용 가능할 것으로 생각된다. 또한 향 후 연구에서 F12 분획물로부터 세포 독성이 없으면서 항균능이 뛰어난 단일 화합물을 추출할 수 있을 것으로 기대된다.

감사의 글

이 논문은 2014학년도 조선대학교 학술연구비의 지원을 받아 연구되었음.

Conflict of interest

The authors declare that they have no competing interest.

References

1. Asmussen, E. Softening of BISGMA-based polymers by ethanol and by organic acids of plaque. Scand J Dent Res. 1984;92: 257-261.
2. Kähkönen MP, Hopia AI, Vuorela HJ, Rauha JP, Pihlaja K, Kujala TS, Heinonen M. Antioxidant activity of plant extracts containing phenolic compounds. J Agric Food Chem. 1999;47:3954-962.
3. Weiner R., Millstein P, Hoang E, Marshall D. The effect of alcoholic and non-alcoholic mouthwashes on heat-treated composite resin. Oper Dent. 1997;22:249-253.
4. Slots J. Subgingival microflora and periodontal disease. J Clin Periodontol. 1979;6:351-382.
5. Haffajee AD, Socransky SS. Microbial etiological agents of destructive periodontal diseases. Periodontol 2000. 1994;5:78-111.
6. Darveau RP, Tanner A, Page RC. The microbial challenge in periodontitis. Periodontol 2000. 1997;14:12-32.
7. Lee ES, Ahn TY, Yoon JJ, Kook JK, Lee BR, Kim DK. Restraint effect on leaf-extract from *Camellia sinensis* and seed-extract from *Casia tora* against periodontopathogens. J Korean Acad Dent Health. 2003;27:569-569.
8. Park SN, Lim YK, Freire MO, Cho E, Jin D, Kook JK. Antimicrobial effect of linalool and α-terpineol against periodontopathic and cariogenic bacteria. Anaerobe. 2012;18:369-372.
9. Kim MJ, Kim CS, Ha WH, Kim BH, Lim YK, Park SN, Cho YJ, Kim M, Ko JH, Kwon SS, Ko YM, Kook JK. Antimicrobial effects of oleanolic acid against *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sobrinus* isolated from a Korean population. Int J Oral Biol. 2010;35:191-195.
10. Kim MJ, Kim CS, Park JY, Lim YK, Park SN, Ahn SJ, Jin DC, Kim TH, Kook JK. Antimicrobial effects of ursolic acid against mutans streptococci isolated from Koreans. Int J Oral Biol. 2011;36:7-11.
11. Eo HJ, Park JH, Park GH, Lee MH, Lee JR, Koo JS, Jeong JB. Anti-inflammatory and anti-cancer activity of mulberry (*Morus alba* L.) root bark. BMC Complement Altern Med. 2014;14:200.
12. Hunyadi A, Herke I, Veres K, Erdei A, Simon A, Tóthb G. Volatile glycosides from the leaves of *Morus alba* with a potential contribution to the complex anti-diabetic activity. Nat Prod Commun. 2014;9:145-147.
13. Islam B, Khan SN, Haque I, Alam M, Mushfiq M, Khan AU. Novel anti-adherence activity of mulberry leaves: inhibition of *Streptococcus mutans* biofilm by 1-deoxynojirimycin isolated from *Morus alba*. J Antimicrob Chemother. 2008;62:751-757.
14. Lee JH, Bae SY, Oh M, Kim KH, Chung MS. Antiviral effects of mulberry (*Morus alba*) juice and its fractions on foodborne viral surrogates. Foodborne Pathog Dis. 2014;11:224-229.
15. Lee YJ, Choi DH, Kim EJ, Kim HY, Kwon TO, Kang DG, Lee HS. Hypotensive, hypolipidemic, and vascular protective effects of *Morus alba* L. in rats fed an atherogenic diet. Am J Chin Med. 2011;39:39-52.
16. Park KM, You JS, Lee HY, Baek NI, Hwang JK. Kuwanon G: an antibacterial agent from the root bark of *Morus alba* against oral pathogens. J Ethnopharmacol. 2003;84:181-185.
17. Tirupathi RG, Suresh BK, Ujwal KJ, Sujana P, Raoa AV, Sreedhar AS. Anti-microbial principles of selected remedial plants from Southern India. Asian Pac J Trop Biomed. 2011;1:298-305.
18. Wang Y, Xiang L, Wang C, Tang C, He X. Antidiabetic and antioxidant effects and phytochemicals of mulberry fruit (*Morus alba* L.) polyphenol enhanced extract. PLoS One. 2013;8:e71144.
19. Kim MJ, Kim CS, Park JY, Park SN, Yoo SY, Lee SY, Kook JK. Bacterial model system for screening and determining optimal concentration of anti-caries natural extracts. J Microbiol. 2011;49:165-168.
20. Park SN, Kook JK. Antimicrobial activity of oleanolic acid, ursolic acid, and sophoraflavanone G against periodontopathogens. Int J Oral Biol. 2013;38:149-154.